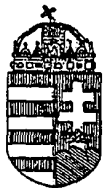


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

**SZABADALMI
LEÍRÁS
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY**

(11) Lajstromszám:

210 122 B

(21) A bejelentés száma: 1484/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 23.

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 35/60
A 61 K 31/20
A 61 K 33/04
A 61 K 35/72

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(72) Feltaláló:

A feltalálók nevük feltüntetésének mellőzését kérték,
(HU)

(73) Szabadalmas:

BIOREX Kutató-Fejlesztő Kft., Budapest (HU)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

**(54) Eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható
gyógyászati készítmény előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány a szívre és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy 0,5–50 tömeg%-ban szeléntartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–

0,5 tömeg% 18–24-szénatomos, legalább két kettős kötést tartalmazó egy vagy több telítetlen zsírsavat kívánt esetben adalékanyagokkal és antioxidánsal elegyítenek és ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítanak.

HU 210 122 B

A találmány tárgya eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolikus állapotaira ható gyógyászati készítmény előállítására.

Ismeretes, hogy a C_{18-24} ω -3 telítetlen zsírsavak előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Közülük is kiemelkedő jelentőségű az eikozapentaénsav /EPA/ és a dokozahexaénsav /DHA/. E két sav fontosságára és sokrétű biológiai hatására mutatnak rá közleményükben Dyerberg és munkatársai (The Lancet, 15, 117 /1978/).

A politelítetlen zsírsavak, ezen belül elsősorban az EPA és a DHA hiperlipidémiában és trombózisos megbetegedésekben játszott fontos szerepével kapcsolatos hatásokat írják le összefoglaló jelleggel Goodnight és munkatársai (Arteriosclerosis 2, 87 /1982/ Review).

Hatóanyagként EPA-t és DHA-t tartalmazó gyógyszerkészítményeket ismertet például a 3 438 630 sz. német szabadalmi leírás elsősorban a vér koleszterinszintjének csökkentésére, továbbá az 5 808 037 és a 6 049 097 sz. japán közrebocsátási iratok szívbetegségben szenvedőknél trombus kialakulásának megelőzésére és agyérelmeszesedés ellen.

Számos közlemény foglalkozik még az EPA és a DHA vérlemezkék aggregációját és így trombusképződést gátló hatásával, így például Spencer és Caraega (Prostagl. Leukotrienes and Med. 23, 129 /1986/) és Knapp és munkatársai (New Engl. Journ. of Med. 314, 937 /1986/).

Az EPA és a DHA vírusellenes hatását ismerteti a 4 513 008 sz. USA-beli szabadalmi leírás.

A halolaj aktív komponensei, így az EPA és a DHA a PG-3 sorozat bioszintézisének prekurzoraként szerepelnek, egyben gátolják az arachidonsavból kiinduló bonyolult biokémiai folyamatok láncolata, az ún. „arachidonsav-kaszád” során keletkező káros hatású metabolitok, mint például a TXA_2 és a TXB_2 képződését.

A politelítetlen zsírsavak számos kedvező hatás mellett azzal a hátrányos patológiás tulajdonsággal rendelkeznek, hogy az emberi szervezetben spontán oxidációs mechanizmusú bomlást szenvednek aktív aldehidek, többek közt a szervezetre káros malonaldehid keletkezése közben. Ezek az aldehidek elsősorban a kötőszövetekkel élettanilag káros reakciókba léphetnek, ami ún. „ceroid lipofuscinosis”-hoz vezethet.

Az utóbbi évtizedben kezdtek foglalkozni a kutatók a mikroelemek és nyomelemek élettani hatásával. Így ismeretessé vált, hogy a szelén az élet egyik legfontosabb, nélkülözhetetlen anyaga. A szelén kedvező hatása főként azon alapszik, hogy aktiválja a glutation-peroxidázt, pontosabban annak prosztesztikus csoportját, amely a káros peroxidációs folyamatok legfontosabb endogén gátlója.

A szelén önmagában hatásos vérnyomáscsökkentő anyag, javítja a szív isémiás, hipoxiás és infarktusos állapotát, megakadályozza a központi idegrendszer ceroid lipofuscinosis. Hatásos peroxidációval kapcsolatos betegségek, például a kőgyulladás/ esetén is. Rákellenes hatása jelentős, bizonyítottan csökkenti a rák kialakulásának lehetőségét. Ezenkívül mutagén inhibitorként is alkalmazható.

A szelén nem kumulálódik a szervezetben, így pótlásáról állandóan gondoskodni kell. Bevitelének mostanáig

főleg szerves szelénvegyületek, így SeO_2 és Na_2SeO_3 alakjában történt. Hiánya májnekrozist, izomelhalást, eritrocita membrán destrukciót, kötőszöveti károsodást eredményezhet, EKG elváltozásként S-T elevációt, ezenkívül kwashiorkor betegséget, sclerosis multiplexet okozhat.

A szelén biológiai hatásairól összefoglaló cikket közölnek Thressa és munkatársai (Nutrition Review 35, 7 /1977/), valamint Shamberger (J. of Env. Path. and Tox. 4, 305 /1980/) és Masukawa és munkatársai (Experientia 39, 405 /1983/).

Szerves szelén-vegyületet egyrészt preparatív szintetikus úton nyerhetünk; ilyen megoldást ismertetnek például Klaiman és Günther: Organic Selenium Compounds, Their Chemistry and Biology /John Wiley and Sons, Inc. New York; 1973/ c. könyvükben, de előállíthatók szerves szelén-vegyületek mikroorganizmusok segítségével is. Utóbbi esetben a mikroorganizmusokat szerves szelén-vegyülettel dúsított tápközegen nevelik. Az erre alkalmas szervezetek a szelént felveszik és azt anyagcseréjükbe vonva szerves anyagokhoz, leggyakrabban aminosavakhoz vagy zsírokhoz kötik. Ilyen eseteket ismertetnek közleményeikben Danch és Chmielowsky (Pr. Nauk. Univ. Slask Katowich 1, 57 /1985/) és Gennity és munkatársai (Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 176 /1984/).

Számos olyan mikroorganizmus ismeretes, amely képes egyes elemeket – így a szelént is – környezetéből összegyűjteni és szervezetében akkumulálni. A 4 530 846 sz. egyesült államokbeli szabadalmi leírás és a 60 224 451 sz. és 57 174 098 sz. japán közrebocsátási iratok szelénrel dúsított élesztőgomba előállítását írják le.

Az élesztő mellett egyéb mikroorganizmusok, így baktériumok, sugárgombák és fonalgombák szelénrel való dúsítását ismerteti a 78 148 587 sz. japán közrebocsátási irat.

A szelén tartalmú élesztőt az 58 129 954 sz. japán közrebocsátási irat szerint növényi olajokhoz keverve öregkori megbetegedések kezelésére javasolják.

A találmány célja olyan új, a szívre és keringési rendszerre ható gyógyászati készítmény előállítása, mely lehetővé teszi a DHA és az EPA, valamint speciális mikroorganizmusok közreműködésével a szerves szelén-tartalmú természetes vegyületek előnyös tulajdonságainak egyesítését, és egyidejűleg teljes mértékben kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak hátrányos tulajdonságait.

A találmány alapja az a felismerés, hogy a fenti cél maradéktalanul elérhető, és a ceroid lipofuscinosis folyamat kiküszöbölésére alkalmas készítmény nyerhető, ha szelén-tartalmú – humán felhasználás szempontjából nem toxikus – mikroorganizmust politelítetlen zsírsavakkal együtt alkalmazunk.

A találmány tárgya eljárás a keringési rendszerre ható gyógyászati készítmények előállítására. A találmány értelmében úgy járunk el, hogy 0,5–50 tömeg% szeléntartalmú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg% 18–24 szénatomos,

legalább két telítetlen kötést tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kívánt esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

A találmány szerinti eljárással célszerűen olyan készítményeket állítunk elő, melyek eikozapentaénsavat /EPA/ és dokozahexaénsavat /DHA/, valamint szeléntartalmú élesztőt tartalmaznak.

A készítmény egyik komponenséül szolgáló C_{18-24} ω -3 telítetlen zsírsavak alapanyagaként különböző tengeri és édesvízi halakból, így elsősorban makrélából, tőkehalból, heringből, szardíniából, tintahalból és busából, továbbá a halak májából nyerhető olajok, például a tőkehalmájolaj /csukamájolaj/ és cápamájolaj használhatók.

A halolajok az EPA-n és a DHA-n kívül nagy mennyiségben tartalmaznak telített és kismértékben telítetlen zsírsavakat, valamint el nem szappanosítható komponenseket. Ezen alkotórészek eltávolítása igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyászati készítmények dózisának növelése érzékenyen emelné a bevitt kalóriát, valamint a vér triglicerid-szintjét. Emellett az el nem szappanosítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitamint /annak provitaminját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó készítménnyel nem lehetne a kívánatos hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból eltávolítjuk a felsorolt alkotóelemeket, így a telített és kismértékben telítetlen zsírsavakat, az el nem szappanosítható alkotóelemeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Ily módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölé dúsul.

Mikroorganizmusként célszerűen olyan törzseket használhatunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi fogyasztásra alkalmasak. Erre a célra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Acetobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Torula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Brettanomyces* sp., *Brevibacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Oidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichospora* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Monascus* sp., *Aspergillus* sp. stb. törzsek fajai.

A találmány szerinti készítmény oxidációjának gátlására aktív tartósítószerként α -tokoferolt /E-vitamin/, glutationt vagy hagyományos antioxidánsokat, mint például butil-hidroxitoluolt célszerű használni.

Vivő- és hordozóanyagként a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például laktózt, keményítőt vagy magnézium-sztearátot alkalmazhatunk.

A farmakológiai vizsgálatok a készítmény egészséget károsító mellékhatásoktól való mentességét igazolták, mert a patkánymáj mikroszomális enzimrendszerében használatos dózis százszoros mennyiségénél sem tapasztaltunk elváltozást. A készítménnyel történő kezelés szignifikáns módon csökkentő a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscin mennyiségét. A találmány szerinti készítménnyel Wistar nőstény patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyértelmű trombocita aggregáció gátlást tapasztaltunk.

A készítmény optimális hatásos napi dózisa /75 kg-os átlagos testtömegre számolva/ 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az élesztőpor grammonként átlagosan 40 μ g szelént tartalmaz.

A találmány szerinti készítmény főbb előnyei a következők:

1. Egyesíti az EPA és a DHA, valamint a szelén és az élesztő előnyös tulajdonságait.

2. Kiküszöböli az ismert halolajtartalmú készítmények azon káros hatásait, melyeket a telített lipid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak fogyasztása esetén fellépő „ceroid lipofuscinosis” lehetőségét.

4. A szelént természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élesztőben feldúsítva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatását előnyösebben fejti ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban így elsősorban élesztőben ipari méreteken, fajlagosan nagy-mennyiségben és olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyászati hatást fejt ki atopikus zavarok esetén, és ekcéma, asztma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus összefüggésű zavarok, például migrén, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, oútis media, nefrotikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Különösen alkalmas a keringési rendszer zavarai, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolikus állapotok, így agyvérzés, infarktus, fiatalokúak Keshan-szindrómája kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

A találmány szerinti készítményhez alkalmazott ω -3 politelítetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerint, a szelénrel dúsított mikroorganizmust pedig a 2-6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7-9. példák a találmány szerinti gyógyászati készítmények előállítását szemléltetik.

1. példa :

24 kg makréla olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter metanolban 50-60 °C közötti hőmérsékleten, keverés közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot csepegtetünk hozzá, majd az elegyet 60 °C-on tartva további 45 percig kevertetjük. Mintegy 60 °C hőmérsékleten 20 kg 15%-os sósavat adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sósavval, majd mintegy 180 liter forró csapvízzel semlegesre mossuk. Az így kialakult fázisokat ismét elválasztjuk. Az olajos fázishoz 100 liter acetont adunk, felmelegítjük mintegy 45 °C-ra, és hozzáöntünk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ -ot. Fél óra keverés után éjszakán át állni hagyjuk, majd leszűrjük, és az aceto-

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűen 85–75 tömeg% 18–24 szénatomos, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy vagy több zsírsavat és/vagy ezek származékait kívánt

esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánssal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként tengeri halak olajából extrahált zsírsavakat használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként 5,8,11,14,17-eikozapentaénsavat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsavat használunk.

nos szűrletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os só-savval megsavanyítjuk és hexánnal háromszor kirázzuk, majd a hexános fázist bepároljuk. A tisztítási művelet során végig N_2 -atmoszférában dolgozunk. Így 6,4 kg tisztított halolajat nyerünk.

Az így tisztított makrélaolaj 1 kg-ját 60 °C-on hozzácszepegtetjük 3 kg karbamid 9 liter metanollal készített oldatához. Az elegyet 2 órán át ezen a hőmérsékleten keverjük. Lehűlés után éjszakán át mélyhűtőben -10 °C-on állni hagyjuk, majd leszűrjük, és a szűrletet bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 hígítású sósavat öntünk, és 15 percig keverjük. Hexánnal kirázzuk, a hexános fázist vízzel semlegesre mossuk, Na_2SO_4 -tal szárítjuk, majd bepároljuk. Így 0,34 kg ω -3 telítetlen zsírsavat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tartalom: 24%; DHA-tartalom: 42%.

2. példa:

5-literes üveg palackokba 2-2 l sterilizált malátakivonatos folyékony táptalajt öntünk, és glükózzal 13% dúsítjuk. 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá, majd beoltjuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőztetéssel 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában újabb 5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészethez.

Szűrés után a sejteket desztillált vízzel többször átmoszuk, majd 68–70 °C-on szárítjuk. Az anyagot mikronizáljuk, majd atomabszorpciós módszerrel meghatározzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

3. példa:

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba 100 ml élesztő-kivonatos folyékony tápoldatot töltünk steril körülmények között, majd 5 µg/ml mennyiségű Na-szelenitet teszünk bele, és beoltjuk *Aspergillus sojae* gombával. 28–30 °C-on rázajuk a tenyészeteket. A tenyésztés 3. napján újabb 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrába. 5 nap eltelte után a szárazanyagot kiszűrjük, moszuk, majd a 2. példa szerinti módon szárítjuk. Mikronizálás után a minta műszeresen meghatározott Se-tartalma 300 µg/g.

4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Torulopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyésztés során nyert mikrobamög Se-tartalma 120 µg/g.

5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített tápoldaton *Streptococcus thermophilus*-t nevelünk 45 °C-on. A nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-tartalma 420 µg/g.

6. példa:

A 3. példával azonos módon neveltünk *Lactobacillus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a táptalajt 1% glükózzal és 2% kalcium-karbonáttal is kiegészítjük. A kapott baktérium 300 µg/g Se-t tartalmaz.

7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrélaolajhoz /EPA-tarta-

lom: 24%, DHA-tartalom: 42%/ 10 g Se-élesztőport keverünk /Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpor/. A keveréket homogenizáljuk. A homogenizátumot 0,1% E-vitaminnal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot lágy zselatin gyöngy kapszulába vagy lágy zselatin kapszulába töltjük, és buborék-csomagolással szereljük ki.

8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használjuk: 400 g 65%-os dúsított tőkealmájolaj, melynek EPA tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztőpor 120 µg/g Se-tartalommal és 0,4 mg E-vitamin. A homogenizátumot 500 mg hatóanyag befogadására alkalmas kapszulába töltjük.

9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az alábbi összetételű tablettákat állítjuk elő:

EPA-ra és DHA-ra nézve dúsított tőkealmájolaj, mely 0,1% E-vitamin tartósítószerrel tartalmaz (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%)	200,0 mg
Se-élesztő (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor)	86,0 mg
Laktóz	140,0 mg
Keményítő	60,0 mg
Polivinil-pirrolidon	3,5 mg
Magnézium-sztearát	3,5 mg

Kívánt esetben a tablettákat drázsírozó gépen cukorral vagy más anyaggal vonjuk be.

A trombocita aggregáció gátló hatást Wistar albino nőstény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o. kezeléssel vizsgáltuk. Az állatok I. csoportja 67% zsírsav-származék és 33% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírsav-származék és 6% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g), a III. csoport 50% zsírsav-származék és 50% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll) csoport 67% fiziológias sóoldat és 33% élesztő (szelén-mentes) keverékét kapta.

A 6 hetes kezelést követően a vena cava inferiorból vért vettünk, a vérmintákat 3,5%-os Na-citráttal összekevertük, centrifugáltuk és a kapott, trombocita-dús plazmában, ADP különböző koncentrációval trombocita aggregációt idéztünk elő. Azt a minimális ADP-koncentrációt, melynél az aggregáció jelentkezik, ADP küszöb-koncentrációnak nevezzük. Ennek átlagos értéke (\bar{X}) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találmány szerinti kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint azt az alábbi táblázat mutatja:

	\bar{X} (µM)
I. csoport	64,5
II. csoport	52,3
III. csoport	88,5
IV. (kontroll) csoport	...

A trombocita aggregáció gátló hatás jelentős, és 50–94% zsírsavat (vagy zsírsav-származékot) és 33–50% élesztőt (Se-tartalmú élesztő) tartalmazó kombináció esetében megfelelően bizonyított.